УДК 619:616.98:578.826.1:57.082.26

С.П. Лазарева, А.В. Ирза, М.И. Шульпин, Б.Л. Манин, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин

ВЫДЕЛЕНИЕ АДЕНОВИРУСОВ ПТИЦ 1 ГРУППЫ МЕТОДОМ ПЕРЕМЕЖАЮЩИХСЯ ПАССАЖЕЙ

Введение

Аденовирусы птиц группы 1 (FAdV) являются этиологическими агентами таких заболеваний, как гидроперикардит и гепатит с включениями [1, 2, 5]. Также FAdV выявляются с другими болезнетворными микроорганизмами при вторичных инфекциях [1]. Аденовирусы птиц группы 1 относятся к семейству *Adenoviridae*, роду *Aviadenovirus*. В настоящее время известно 12 серотипов, входящих в эту группу. Геном FAdV представлен двунитчатой ДНК. У вириона отсутствует липопротеиновая оболочка. Аденовирусы птиц обладают высокой устойчивостью в окружающей среде, что способствует широкому распространению. К FAdV чувствительны птицы всех возрастов [2]. Смертность в ряде случаев может быть очень высокой, у бройлеров – 20-75%, а у несушек – 5-8% [5]. Аденовирусы способны передаваться как горизонтально, так и вертикально [2].

В настоящее время для выделения возбудителя широко применяются культура клеток печени куриного эмбриона, поскольку FAdV обладают тропностью к гепатоцитам, и культура клеток почки цыплёнка. По мнению некоторых исследователей, чувствительность клеток печени куриного эмбриона к данному вирусу выше, по сравнению с клетками почки цыплёнка [3]. Клетки, поражённые вирусом, округляются, в ядрах появляются базофильные включения. Клетки трахеи кур и фибробласты куриного эмбриона не обладают такой чувствительностью [2].

Аденовирусы птиц размножаются также в куриных эмбрионах. Наибольший титр вируса достигается при инокуляции в хориоаллантоисную мембрану или в желточный мешок. При действии вируса можно наблюдать замедленный рост, геморрагии, гибель и скручивание эмбрионов [3]. При таком способе заражения поддерживается рост 11 серотипов вируса.

Основным способом защиты от инфекции является специфическая профилактика. На данный момент разработан и применяется в коммерческом птицеводстве ряд инактивированных гидроокисьалюминиевых или эмульсионных вакцин. Тем не менее, из-за многообразия серологических вариантов FAdV, вакцинация не всегда защищает от инфекции изолятов гетерологичных серотипов. Также остается не выясненной роль в патогенезе многих серотипов FAdV.

Таким образом, остаются актуальными исследования, направленные на определение патогенности FAdV различных серотипов. Одним из первых условий в изучении патогенности полевых изолятов является адаптация их к лабораторным системам для культивирования вируса.

Целью данной работы было выделение полевых изолятов аденовируса птиц 1 группы к культуре клеток с помощью серии перемежающих пассажей. Данные исследования были направлены на изучение возможности применения перемежающих пассажей для адаптации полевых изолятов к культуре клеток LMH.

Материалы и методы

Патологический материал. Для выделения аденовирусов использовали образцы патологического материала, полученного с птицефабрики Ростовской обл., поступившие в ФГУ «ВНИИЗЖ» в декабре 2006 года. Образцы представляли собой фрагменты печени 30-дневных цыплят.

Проведение ПЦР. Для выявления аденовирусов и их генетической дифференциации применяли ПЦР. Часть патматериала применялась с целью диагностики вирусной инфекции. Выделение суммарной ДНК из образцов проводили с использованием коммерческого набора для выделения ДНК с сорбентом Нуклеос+ (БиоКом, г. Москва), согласно инструкции производителя. Для выявления аденовируса в ПЦР использовались праймеры, универсальные для всех генетических групп FAdV. В случае положительного результата проводилась реакция, позволяющая дифференцировать группы с использованием групспецифических праймеров (B, D1, D2). Последовательность праймеров указана в табл. 1.

Реакционная смесь для амплификации включала в себя: ПЦР-буфер 1х-кратный, $MgCl_2$ 2,5mM, dNTP 10mM каждого, праймеры 10 pM, Taq-ДНК полимеразы 2,5 ед., раствор суммарной ДНК-5 мкл (3 мкл для nested), H_2O до конечного объема в 25 мкл.

Таблица 1

Последовательность праймеров

Генетическая группа	Обозначение праймера	Последовательность (5'– 3')
U	favU-f2716	AAC GGT TAT (A/C)GG TTC TGG CC
	nested favU-f2766	TGC G(C/A)A ACT TCG ACC CCA TG
	nested favU-r3271	CGG CGT TGC CTG TGG CGA AA
	favU-r3278	GTT TAC AC(G/C) GCG TTG CCT GT
B	favb_f58	CGG CTG CAG ATC CGC TAC TA
	nested favb_f115	GTT CGC TAC AGC TTG ACA GT
	nested favb_r471	GGC GAA ACG GGC CAT AAG TC
	favb_r496	ATT TGT TGT TCG TGG CTC CT
D1	favd1-f175	GAC ATC AAA GGG GTG CTC GA
	nested favd1-f186	GGT GCT CGA CAG AGG TCC TT
	nested favd1-r730	CCG ATG TAG TGG GTC TGT T
	favd1-r848	TTC GGT GTT TCG GTC CTG CA
D2	favd2-f309	CAC GGG TCA GAT GAC AAC TC
	nested favd2-f356	AAA GAC AAG ACT GCC GCG AT
	nested favd2-r623	GTC TTC GAC TCC TAT GAC TC
	favd2-r643	TAG GTT AGC GAG GCG CTA AA

Таблица 2

Размеры амплифицированных фрагментов

Вирус	I ПЦР		II ПЦР	
	праймеры	фрагмент, п.н.	праймеры	фрагмент, п.н.
Адено	U I (U2, U8)	562	U II (U3, U7)	505
	B I (B1, B4)	438	B II (B2, B3)	356
	D1 I (D1-1, D1-6)	673	D1 II (D1-2, D1-5)	544
	D2 I (D2-1, D2-5)	361	D2 II (D2-2, D2-4)	287

Температурный режим цикла для первой реакции составляет: 94°С – 30 с, 55°С – 30 с и 72°С – 45 с. Количество циклов-35. Для второй реакции: 94°С – 30 с, 58°С – 30 с и 72°С – 40 с. Количество циклов-25.

Результат реакции оценивали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Положительным результатом считали присутствие полосы ожидаемой длины (см. табл. 2).

Заражение куриных эмбрионов полевыми изолятами аденовируса. Фрагменты патматериала использовались для проведения 1 пассажа на куриных эмбрионах. Из образцов данных органов готовили 10% суспензию на растворе Хенкса, пропускали через бактериальный фильтр Millex GP (Millipore) с диаметром пор ячейки 0,22 мкм.

Для выделения вируса применялись 10-суточные SPF-куриные эмбрионы. Эмбрионы заражали в аллантоисную полость суспензией в количестве 0,2 мл и инкубировали при 37° С 7 суток. Для получения вирусного материала отбирали экстраэмбриональную жидкость.

Заражение культуры клеток LMH (культура клеток гепатомы цыплёнка). Полученную в результате 1 пассажа аллантоисную жидкость использовали для заражения перевиваемой культуры клеток LMH. Для поддержания этой культуры использовали среды ПСП и DMEM с L-глютамином и повышенным содержанием глюкозы с добавлением эмбриональной сыворотки КРС в количестве 2% от объёма среды. Для заражения вносили по 0,2 мл вируссодержащей суспензии. Инкубировали при 37° С до появления ЦПД на 70% поверхности монослоя.

Для снятия монослоя среду сливали, а клетки смывали со стенок сосуда бессывороточной средой и ресуспендировали. Полученную суспензию хранили при -70° С.

Приготовление первично трипсинизированной культуры клеток печени куриного эмбриона. Для изучения оптимальных условий культивирования в работе применялась первично трипсинизированная культура клеток печени куриного эм-

Таблица 3

Результаты выделения аденовируса

Номер пассажа	Материал	Система для выделения вируса	Результат микроскопии	Результат ПЦР
1	фрагменты печени цыплят, инфицированных аденовирусом	куриные эмбрионы	видимых патологий нет	B++* D1++ D2++
2a	материал 1п	куриные эмбрионы	видимых патологий нет	отрицательный
2b	материал 1п	культура клеток LMH, поддерживающая среда - ПСП	видны скопления округлившихся клеток	B- D1++ D2+
2c	материал 1п	культура клеток LMH, поддерживающая среда - DMEM	видны скопления округлившихся клеток	B- D1++ D2+
3a	материал 2ап	куриные эмбрионы	видимых патологий нет	отрицательный
3b	материал 2b	культура клеток LMH, поддерживающая среда - DMEM	видны скопления округлившихся клеток	B+ D1++ D2-
3c	материал 2c	культура клеток печени куриного эмбриона	образование участков с округлыми клетками, содержащими цитоплазматические включения	B+ D1++ D2-
4a	материал 3b	культура клеток печени куриного эмбриона	образование участков с округлыми клетками, содержащими цитоплазматические включения	B- D1++ D2-
4в	материал 3c	культура клеток печени куриного эмбриона	образование участков с округлыми клетками, содержащими цитоплазматические включения	B++ D1++ D2-

* + результат ПЦР положительный после второго раунда;
++ результат ПЦР положительный после первого раунда;
- результат ПЦР отрицательный

бриона. Для получения данной культуры клеток использовали SPF-эмбрионы 13-14-суточного возраста. Работу проводили в условиях стерильного бокса. На тупом конце яйца делали надкол, вводили в него браншу ножниц и срезали скорлупу. Содержимое извлекали пинцетом, ножницами отрезали желточный мешок, а эмбрион переносили в стерильную чашку Петри. В работе применялись живые эмбрионы.

У эмбриона извлекали печень и удаляли желчный пузырь. Печень помещали в раствор Хенкса, содержавший препарат Antibiotic/Antimycotic (PAA Laboratories) в количестве 1:100, отмывали от эритроцитов дважды раствором Хенкса, измельчали ножницами и переносили в колбу Раппопорта. Добавляли 0,125% раствора трипсина, подогретого до 37°С, из расчета 50 мл на 30-40 эмбрионов, и инкубировали в течение 5 мин. при интенсивном помешивании. Полученную смесь сливали в центрифужный флакон, пропуская через крупнопористый фильтр. Обработку трипсином повторяли 4 раза. Сосуд с фильтратом помещали на лёд для ослабления действия трипсина на клетки. В фильтрат добавляли эмбриональную бычью сыворотку до концентрации 2-3% для инактивации трипсина.

Профильтрованную клеточную суспензию центрифугировали в течение 10 мин. при 95 g. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, а к клеточному осадку добавляли 50 мл ростовой среды (полусинтетической пристеночной - ПСП), затем клетки тщательно ресуспендировали. Клеточную суспензию разводили до нужного объёма ростовой средой с 10% фетальной сыворотки КРС. Посевная концентрация должна составлять 800-950 тыс. кл/мл. Для получения монослоя использовали культуральные флаконы объёмом 50 мл (costar). В каждый флакон добавляли 10 мл суспензии и инкубировали при 37°С в CO_2-инкубаторе. Клеточный монослой формировался через 48-72 ч.

Заражение культуры клеток печени куриного эмбриона. Культуру клеток печени куриного эмбриона заражали вируссодержащим материалом, полученным от предыдущих пассажей на LMH. Для зара-

жения брали культуральные сосуды с приготовленной ранее культурой клеток. Монослой должен покрывать не менее 80% площади дна сосуда. Из сосудов с культурой клеток сливали ростовую среду, монослой промывали раствором Хенкса, вносили вируссодержащую жидкость по 0,2 мл и инкубировали в течение 30 мин. в CO_2-инкубаторе. Затем добавляли по 10 мл поддерживающей среды ПСП, содержащей 2% эмбриональной бычьей сыворотки. Инкубировали при 37°С до появления ЦПД на 70% поверхности монослоя. После замораживания-оттаивания вируссодержащую суспензию сливали и хранили при -70°С.

Результаты и обсуждение

С помощью методов ПЦР и нуклеотидного секвенирования в исследуемом материале были выявлены три изолята аденовируса, обозначенные как *Rostov/2007/02/chicken/B* (серотип 5), *Rostov/2007/01/chicken/d1* (серотип 8) и *Rostov/2007/02/chicken/d2* (серотип 11); присвоенные номера в GeneBank EF442425, EF442426, EF442427, соответственно, относящиеся к разным генетическим группам: B, D1 и D2.

Вируссодержащую суспензию, приготовленную из органов, использовали для заражения куриных эмбрионов (табл. 3). При исследовании экстраэмбриональной жидкости, полученной после проведения 1 пассажа, были идентифицированы изоляты групп B, D1, D2. Эти изоляты были протестированы с помощью однораундовой ПЦР, что указывает на высокое содержание вируса в полученном материале. Однако при проведении 2 и 3 пассажей на куриных эмбрионах вирус не выявлен. Таким образом, куриные эмбрионы не являются подходящей системой для дальнейших пассажей аденовируса.

Поэтому для проведения второго пассажа была применена культура клеток LMH. Пассаж проводился с использованием сред DMEM и ПСП. В результате пассирования изолят группы D1 выявлялся с помощью однораундовой ПЦР, а изолят группы D2 – с помощью двухраундовой ПЦР в обеих пробах. В данном случае изоляты группы B не выявлялись. Все дальнейшие пассажи на LMH проводились с использованием среды DMEM. С помощью микроскопии в культуре было выявлено ЦПД в виде скоплений округлившихся клеток. В результате проведения 3 пассажа в вируссодержащем материале были выявлены изоляты групп B (с помощью однораундовой ПЦР) и D1 (с помощью двухраундовой ПЦР) (табл. 3). Таким образом, в результате пассирования изолятов групп B, D1, D2 в культуре клеток LMH мы наблюдали сначала снижение репликации изолятов, а затем – её повышение.

Дальнейшие пассажи проводились на культуре клеток печени куриного эмбриона. Для заражения были взяты 2 и 3 пассажи. Под действием вируса происходило округление клеток в культуре и появление в них включений. В образце материала 3 пассажа были выявлены изоляты группы B во 2 раунде ПЦР и группы D1 – в 1 раунде ПЦР, а в суспензии, полученной с 4 пассажа – группы D1 (в 1 раунде ПЦР) (табл. 3).

В 3 пассаже наблюдали увеличение уровня репликации изолята группы B, но он выявлялся во 2 раунде ПЦР, а значит, реплицировался в незначительном количестве. В результате 4 пассажа изолят группы B методом ПЦР не выявлялся. На заключительном этапе был проведён 4 пассаж материала, содержащего изоляты групп B и D1 (результаты положительные в 1 раунде ПЦР) (табл. 3). Изолят группы B сработал в 1 раунде ПЦР, следовательно, его содержание на 5 пассаже увеличилось. Таким образом, в ходе проведённых исследований мы наблюдали различную чувствительность культуры клеток печени куриных эмбрионов и культуры клеток LMH к инфицированию полевыми изолятами генетических групп B, D1, D2 (серотипы 5, 8 и 11, соответственно).

В ходе проведенной работы установлено, что изоляты обладали разной способностью адаптации к различным системам культивирования. При этом показано, что недостаточно применения только куриных эмбрионов как системы для выделения вируса. Необходимо чередование культур, чтобы вирус стабильно реплицировался. Для культивирования изолята *Rostov/2007/02/chicken/d2* испытанные системы оказались неоптимальными. Изолят *Rostov/2007/01/chicken/d1* эффективно реплицировался во всех использованных системах. Изолят *Rostov/2007/01/chicken/d1* адаптировался к репликации в культуре клеток, но для этого необходимо было провести 4 перемежающих пассажа на куриных эмбрионах и культуре клеток. После второго пассажа титры изолята D2 снижались, и для дальнейшего пассирования необходимо применять другие культуры клеток. В работе, представленной H.S. Alexander и др., также указывалось на то, что оптимальной системой для размножения 8 серотипа (FAdV-8) является перевиваемая линия клеток гепатомы цыплёнка

CH-SAH (6), сходная по происхождению с использованной в наших исследованиях LMH. Эта группа учёных доказала, что титр накопленного вируса в культуре CH-SAH в 100 раз выше, чем в культуре клеток печени эмбриона цыплёнка.

Выводы

Выделены два полевых изолята, относящиеся к генетическим группам B (серотип 5) и D1 (серотип 8). Для выделения использовали перемежающиеся пассажи на куриных эмбрионах, культурах клеток печени куриного эмбриона и LMH. Установлено, что применение только куриных эмбрионов неэффективно для пассирования полевых изолятов аденовируса птиц 1 группы. Проведение заключительных пассажей на культурах клеток печени куриного эмбриона и LMH позволило выделить вышеперечисленные изоляты.

РЕЗЮМЕ

В результате проведённой работы были выделены два полевых изолята аденовирусов птиц 1 группы, относящиеся к генетическим группам B (серотип 5) и D1 (серотип 8). Для выделения использовали перемежающиеся пассажи на куриных эмбрионах, культурах клеток LMH и печени куриного эмбриона. Установлено, что применение только куриных эмбрионов не эффективно для пассирования полевых изолятов аденовируса птиц 1 группы. Проведение заключительных пассажей на культурах клеток печени куриного эмбриона и LMH позволило выделить вышеперечисленные изоляты.

SUMMARY

Three field isolates FAdVs-1, belonging to various genetic groups were isolated using discontinuous passage in chicken embryos, LMH and chicken embryo liver cell cultures. Two isolates were adapted to cell culture, they efficiently replicated in vitro. Chicken embryos were shown to be inefficient for the virus passage. Therefore, the isolation of FAdVs-1 belonging to B, D1 and D2 genetic groups requires LMH and chicken embryo liver cell cultures.

Литература

1. Бакулин, В.А. Аденовирусный гепатит с тельцами-включениями-гидроперикардит кур / В.А. Бакулин //Зооиндустрия. 2005. №2. с. 2-3.
2. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / Б.У. Калнек, Х. Джон Барн, Ч. У. Биэр [и др.]; / пер. с англ. И. Григорьева, С. Дорош, Н. Хрущёва, [и др.] М.: Аквариум-Бук, 2003. 1232 с. + 32 с. вкл., ил.
3. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина. М.: ВНИТИБП. 928 с., ил.
4. Диагностика и профилактика аденовирусных болезней сельскохозяйственной птицы /В.В. Борисов, А.В. Борисов, В.В. Дрыгин [и др.] //Современные аспекты патологии животных: докл. посвящён 40-летию со дня основания института. Владимир, 1999. С. 127-136.
5. Назаров, Р.И. Синдром гидроперикардита – новая угроза птицеводству /Р.И. Назаров, Д.С. Сурнев // Актуальные проблемы болезней животных в современных условиях: материалы Междунар. Науч.-практ. конф. Душанбе, 2003. С. 134-135.
6. Growth characteristics of fowl adenovirus type 8 in a chicken hepatoma cell line / H.S. Alexander, P. Huber, J. Cao [et al.] // Virol. Methods. 1998. Vol. 74, № 1. P. 9-14.

УДК 619:578.831.1:616-079.4

И.П. Пчелкина, С.Н. Колосов, Т.Б. Манин, И.А. Чвала, Л.О. Щербакова, С.К. Старов, В.В. Дрыгин

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2006 ГОДУ

Введение

Ньюкаслская болезнь (НБ) относится к особо опасным болезням птиц. Возбудителем НБ является парамиксовирус птиц 1 (APMV-1). APMV объединены в род *Avulovirus* семейства *Paramyxoviridae* [16]. Парамиксовирус голубей типа 1 (PPMV-1) является антигенным и генетическим вариантом APMV-1. PPMV-1 представляет угрозу для сельскохозяйственных птиц, поскольку может инфицировать и вызвать заболевание домашних птиц [8]. Парамиксовирусы обладают одноцепочечным несегментированным РНК-геномом негативной полярности, состоящим более чем из 15 000 нуклеотидов. Геном ВНБ содержит 6 генов в порядке 3’-NP-P-M-F-HN-L-5’, которые кодируют 6 главных полипептидов